

莫熙礼,吴彤林,李松克,等. 花椒提取物对薏苡黑粉病菌的抑菌机理[J]. 江苏农业科学,2015,43(8):131-133.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.08.042

花椒提取物对薏苡黑粉病菌的抑菌机理

莫熙礼, 吴彤林, 李松克, 李本华, 江厚成, 白美发

(黔西南民族职业技术学院, 贵州兴义 562400)

摘要:从角质酶、果胶酶、纤维素酶以及细胞膜透性等方面研究花椒提取物对薏苡黑粉病菌的抑制机理。结果表明:花椒提取物处理后,黑粉病菌的果胶酶和纤维素酶的活性显著弱于对照,说明花椒提取物能够抑制病原物的致病相关酶活性的表达,进而减轻黑粉病菌的危害;花椒提取物处理后,孢子培养液的电导率及其变化率都随着时间的延长而变大,处理 9 h 后菌丝电导率变化率为 9.52%,说明花椒提取物对菌丝的细胞膜有很强的破坏作用,导致细胞内电解质外渗,从而迅速增加菌丝培养液的电导率。黑粉病菌的果胶酶以及纤维素酶的活性都在 6 h 时达到峰值,之后活性开始降低,说明该病菌在 6 h 时能够冲破植物各种抵抗屏障,成功侵入寄主植物。黑粉病菌分泌的角质酶的量很低,这可能是薏苡黑粉病菌极少能从薏苡叶片侵入的关键因子之一。

关键词:花椒;抑制机理;黑粉病菌;薏苡

中图分类号:S435.19 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2015)08-0131-02

薏苡(*Coix lacrymajobi* L. var. *frumentac*)别称六谷子、珍珠米等,是贵州省黔西南极具特色的主要经济作物,为贵州省黔西南州农村经济发展、农民增收作出了重要贡献。近年来,随着薏苡种植规模的扩大,薏苡黑粉病大面积频繁发生,直接影响了薏苡的产量和质量,而且呈现出逐年上升的趋势,已成为薏苡生产的重要制约因素,对贵州省黔西南州薏苡种植区农民的经济收入构成了严重威胁。植物源杀菌剂对薏苡黑粉病抑制作用方面的研究国内外未见报道。由于对该病害的病原物还不甚了解,因此对该病害的防治也比较盲目。植物源杀菌剂是指用具有杀菌、抑菌活性的植物部位或有效成分提取物以及分离纯化的单体物质加工而成的用于防治植物病害的药剂^[1]。因此,加强新型天然植物源杀菌剂的研制具有重要的现实意义。

植物病原菌侵入植物需要克服 2 道屏障——角质层和细胞壁。病原物通过合成和分泌角质酶降解植物体表的角质,以冲破第 1 道屏障,降低植物自身的防御能力^[2]。很多植物病原菌都能分泌各种细胞壁降解酶,这些酶能够降解细胞壁,是真菌的重要致病因子之一^[3]。因此,本试验在已有研究基础上,从花椒提取物对薏苡黑粉病菌角质酶和细胞降解酶的抑制作用方面研究植物提取物抑菌机制,为进一步阐明植物提取物对病原菌抑制机理提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 病原菌

薏苡黑粉病菌采集于黔西南州农作物科学研究所薏苡示范基地。在薏苡果实上分离得到病瘤,风干后存放于纸盒内,

于 4 ℃ 冰箱内保存备用。使用前将病瘤碾碎并过 40 目筛,得到菌粉。

1.2 花椒提取物的制备

花椒采集于贵州省兴义市顶效。将阴干的植物材料放至恒温烘箱内 50 ℃ 烘干,粉碎后过 40 目筛,置于密封袋中,低温保存备用。花椒的提取采取 CEP 提取法^[4],将花椒提取物配制浓度为 0.125 mg/mL 的溶液。

1.3 角质酶活性的测定

称取 0.05 mg 菌粉放置于 1 000 mL 角质酶培养液中,分为 2 等份。处理组添加 10 mL 花椒提取物溶液,对照(CK)添加 10 mL 蒸馏水,分别于处理后 0、3、6、9 d 测定角质酶活性的变化。角质酶培养液的配制、酶粗液的提取及酶活性的测定(波长 405 nm)参考吴洁云的方法^[5]。以 1 mg 酶蛋白 1 min 内吸光度为 1 个酶单位(U)。

1.4 β -1,4-内切葡聚糖酶(EG)活性的测定

称取 0.05 mg 菌粉放置于 1 000 mL EG 培养液中,分为 2 等份。处理组添加 10 mL 花椒提取物溶液,对照(CK)添加 10 mL 蒸馏水,分别于处理后 0、3、6、9 d 测定 EG 活性的变化。培养液的配制、酶粗液的提取以及 EG 活性(540 nm)的测定参考董小梅的方法^[6]。以 1 h 1 mg 蛋白催化底物产生 1 μ mol 还原糖所需的酶量为 1 个酶单位(U)。

1.5 果胶酶活性的测定

称取 0.05 mg 菌粉放置于 1 000 mL 果胶酶培养液中,分为 2 等份。处理组添加 10 mL 花椒提取物溶液,对照(CK)添加 10 mL 蒸馏水,分别于处理后 0、3、6、9 d 测定多聚半乳糖醛酶(PG)、果胶甲基半乳糖醛酶(PMG)活性的变化。果胶酶培养液的配制、酶粗液的提取、PG 以及 PMG 活性的测定(540 nm)参考杨迎青等的方法^[7]。以 1 h 1 mg 蛋白催化底物产生 1 μ mol 还原糖所需的酶量为 1 酶单位(U)。

1.6 细胞膜透性的检测

细胞膜透性的测定参考杨海清的方法^[8]。

收稿日期:2015-03-28

基金项目:贵州省科技计划;贵州省星火计划(编号:黔科合农字[2013]5035);贵州省黔西南州科技计划(编号:2014-19)。

作者简介:莫熙礼(1982—),男,广西梧州人,硕士,讲师,从事植物病虫害防治教学和科研工作。E-mail:moxili1982@163.com。

2 结果与分析

2.1 花椒提取物对黑粉病菌角质酶活性的影响

由图 1 可知,花椒提取物处理后,薏苡黑粉病菌孢子产生角质酶活性与对照处理差异不明显,且角质酶活性都很弱。对照和花椒处理的角质酶都在 6 h 时到达峰值。

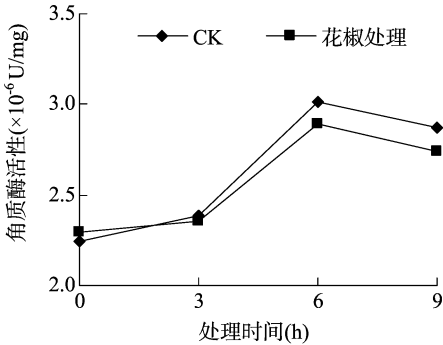


图1 花椒提取物对黑粉病菌角质酶活性的影响

2.2 花椒提取物对黑粉病菌 EG 活性的影响

由图 2 可见,对照黑粉病菌 EG 活性增强较快,于 6 h 时达到峰值,且花椒提取物处理的黑粉病菌 EG 活性明显弱于对照。说明花椒提取物能够减弱制病菌的 EG 活性。

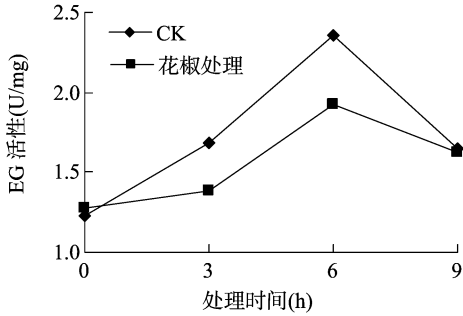


图2 花椒提取物对黑粉病菌 EG 活性的影响

2.3 花椒提取物对黑粉病菌果胶酶活性的影响

图 3、图 4 表明,对照病菌 PG、PMG 活性从开始就逐渐增强,于 6 h 时都到达峰值,而花椒提取物处理病菌 PG、PMG 活性在试验过程中增强不明显。说明花椒提取物对黑粉病菌果胶酶有抑制作用。

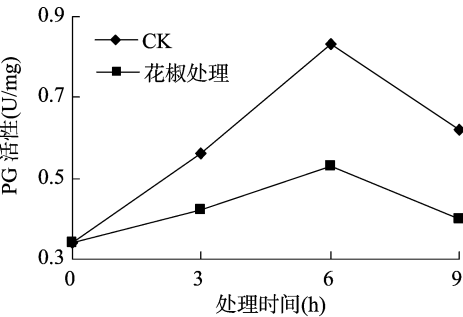


图3 花椒提取物对黑粉病菌 PG 活性的影响

2.4 花椒提取物对薏苡黑粉菌细胞膜透性的影响

试验结果(表 1)表明,经花椒提取物处理后,孢子培养液的电导率及其变化率都随着时间的延长而变大。经花椒提取物处理 6 d 后,菌丝的电导率显著高于 CK。处理 9 h 后,菌丝的电导率变化率达到 9.52%。说明花椒提取物对菌丝的细

胞膜有很强的破坏作用,导致细胞内电解质外渗,从而迅速提高了菌丝培养液的电导率。

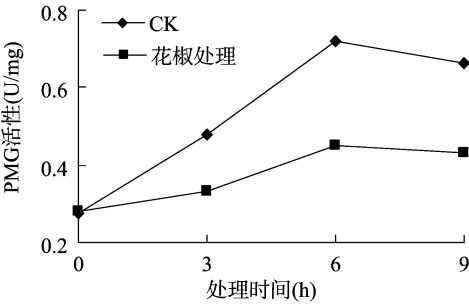


图4 花椒提取物对黑粉病菌 PMG 活性的影响

表 1 花椒提取物薏苡黑粉病菌细胞膜透性的影响

组别	不同时间电导率(μS/cm)				电导率变化率(%)		
	0 h	3 h	6 h	9 h	3 h	6 h	9 h
试验组	23.1a	23.4a	24.2a	25.3a	1.29a	4.76a	9.52a
CK	23.2a	23.2a	23.3b	24.4b	0b	0.87b	1.74b

注:同列数据后不同字母表示差异显著(P<0.05)。

3 结论与讨论

角质层是阻止病原真菌侵入寄主植物的第 1 道屏障,很多植物病原菌通过合成和分泌角质酶迅速降解寄主植物的角质,降低其防御能力,以达到侵害的目的^[2]。国外学者在病原物侵入位点发现了角质酶的存在,且病原物的致病性与角质酶的表达量呈正相关^[9]。因此,降低某种病原物角质酶的表达量,可以一定程度上减轻该病原物的危害。Li 等研究发现,缺少角质酶基因的菌株不能直接冲破油菜叶片的角质层^[10]。本研究发现,黑粉病菌分泌的角质酶的量很小,可能不足以破坏寄主的角质层。这可能是薏苡黑粉病菌极少能从薏苡叶片侵入的重要因子之一。

细胞壁是阻止病原真菌侵入的第 2 道屏障,大部分植物病原真菌通过分泌细胞壁降解酶降解细胞壁,从而达到危害寄主植物的目的^[3]。因此,提高植物抵抗细胞壁降解酶的能力或者抑制细胞壁降解酶的表达量,可以达到减轻病原物危害的目的。本试验结果表明,经花椒提取物处理薏苡黑粉病菌后,该病菌的细胞壁降解酶(β-1,4-内切葡聚糖酶、多聚半乳糖醛酶以及果胶甲基半乳糖醛酸酶)表达量明显低于对照,说明花椒提取物对病原菌的细胞壁降解酶具有很强的抑制作用。

本试验用电导率仪测定了花椒提取物对薏苡黑粉病菌菌丝细胞膜的影响,结果表明花椒提取物对黑粉病菌菌丝细胞膜具有很强的破坏作用,破坏作用随着时间的延长而增强,这与杨海清的研究结果^[8]相符。

本试验还发现,薏苡黑粉病菌细胞壁降解酶活性均在 6 h 时达到峰值,之后开始减弱。说明该病菌只需 6 h 就能够完全激发各种致病相关酶的活性,最大程度破坏寄主植物的各种抵抗屏障,成功侵入寄主植物。

参考文献:

[1] Swain T. Secondary compounds as protective agents[J]. Annual Review of Plant Physiology, 1977, 28:479-501.

毕云飞, 苏小俊, 蒋芳玲, 等. 外源水杨酸对高温胁迫下甘蓝幼苗生长及生理特性的影响[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(8): 133–138.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.08.043

外源水杨酸对高温胁迫下甘蓝幼苗生长及生理特性的影响

毕云飞^{1,2}, 苏小俊¹, 蒋芳玲², 吴震², 苏南², 刘勋²

(1. 江苏省农业科学院蔬菜研究所, 江苏南京 210014; 2. 南京农业大学园艺学院, 江苏南京 210095)

摘要:为探讨外源水杨酸对高温胁迫下甘蓝幼苗耐热性的影响,以甘蓝品种启夏和苏甘 25 号为试验材料,对甘蓝叶片喷施质量浓度为 7.5 mg/L 和 15 mg/L 的水杨酸溶液,以喷施清水为对照,连续喷施 4 d 后置于高温(昼 42 ℃/夜 30 ℃)和常温(昼 22 ℃/夜 15 ℃)下进行处理。结果表明,在生长指标方面,水杨酸可显著促进甘蓝幼苗的根的生长,提高植株的根冠比和启夏的干鲜质量和 *G* 值;在生理指标方面,外源水杨酸可以显著提高因高温胁迫而降低的超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)和抗坏血酸过氧化物酶(APX)活性,降低因高温而显著升高的丙二醛(MDA)含量、脯氨酸(Pro)含量、过氧化氢(H₂O₂)含量和电导率。综合来看,水杨酸可以有效地提高甘蓝幼苗的抗热性,浓度以 15 mg/L 效果较佳。

关键词:水杨酸;高温胁迫;甘蓝;幼苗;生长指标;生理特性

中图分类号: S635.01 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)08-0133-06

结球甘蓝(*Brassica oleracea* var. *capitata*)简称甘蓝,是十字花科芸薹属的一种重要蔬菜,性平味甘,营养丰富,深受消费者喜爱,在中国种植广泛。秋甘蓝播种一般在 6—7 月,易受高温逆境的影响,热胁迫会使甘蓝幼苗的生理代谢紊乱,生长受到抑制或造成徒长,育成的秧苗质量差,抗逆性弱,严重影响后期产量和品质;因此,如何减轻高温胁迫对甘蓝幼苗生长的影响,对甘蓝产业的健康发展至关重要。目前生产上控制夏季育苗甘蓝徒长的方法主要是控水育苗和使用生长调节剂。控水育苗是人为制造干旱环境使植株矮化,但干旱本身是一种胁迫,控水不当极易对秧苗造成伤害,严重时会造成僵

化苗^[1-3],使甘蓝失去商品价值,轻则影响产量,重则绝收,给农户造成重大损失。使用抑制徒长的生长调节剂虽然效果较为显著,但使用不当也会造成后期植株不能恢复正常生长。此外,长期大量使用植物生长调节剂会对环境造成污染。因此,选用环境友好的生长调节剂并确定其适宜的浓度对甘蓝生产具有重要意义。水杨酸(salicylic acid,简称 SA)是植物体内产生的一种简单酚类化合物,是重要的能够激活植物过敏反应和系统获得性抗性的内源信号分子^[4],在诱导植物抗病、耐高温、耐低温、抗盐碱等抗性形成中起十分关键的作用^[5-6]。马德华等研究发现,高温驯化使黄瓜叶片内游离态水杨酸增加 2.5 倍以上^[7]。1~100 μmol/L 水杨酸可保护黄瓜、生菜、葡萄等植物幼苗及组织免受热激伤害^[8-11]。烟草受到热胁迫时其内源水杨酸水平也升高^[12]。但在甘蓝中,水杨酸是否能提高幼苗耐高温的能力,最适浓度为多少还未见报道。为此,本试验以 2 个甘蓝品种苏甘 25 号和启夏为材料,研究高温条件下外源水杨酸对甘蓝生长及生理特性的影响,为提高夏季育苗中甘蓝的耐高温能力提供理论和实践依据。

收稿日期:2015-04-25

基金项目:江苏省农业科技自主创新资金[编号: CX(13)3012];南京农业大学 SRT 项目(编号: 1414A22)。

作者简介:毕云飞(1994—),女,山东淄博人,主要从事蔬菜栽培和育种研究。E-mail: 517702994@qq.com。

通信作者:苏小俊,博士,研究员,主要从事瓜类和十字花科蔬菜遗传育种研究。Tel: (025)84391259; E-mail: xiaojunsu@yahoo.com。

[2] Purdy R E, Kolattukudy P E. Hydrolysis of plant cuticle by plant pathogens. Purification, amino acid composition, and molecular weight of two isozymes of cutinase and a nonspecific esterase from *Fusarium solani* f. *lisi*[J]. *Biochemistry*, 1975, 14(13): 2824–2831.

[3] 杨媚, 杨迎青, 郑丽, 等. 水稻纹枯病菌细胞壁降解酶组分分析、活性测定及其致病作用[J]. *中国水稻科学*, 2012, 26(5): 600–606.

[4] 孙广宁, 宗兆锋. 植物病理学试验技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 2002: 143.

[5] 吴洁云. 灰葡萄孢角酶, 细胞壁降解酶种类及其对番茄植株的致病作用[D]. 扬州: 扬州大学, 2007: 21–24.

[6] 董小梅. 龙眼腐病病菌细胞壁降解酶及其致病机理的研究[D].

福州: 福建农林大学, 2010: 12–14.

[7] 杨迎青, 孟凡, 兰波, 等. 芦笋茎枯病菌细胞壁降解酶活性的测定及条件优化[J]. *华中农业大学学报*, 2014, 33(2): 57–60.

[8] 杨海清. 桃褐腐病致病性及拮抗细菌生防机制的研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2007: 16.

[9] Degani O, Gepstein S, Dosoretz C G. Potential use of cutinase in enzymatic scouring of cotton fiber cuticle[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2002, 102/103(1/2/3/4/5/6): 277–289.

[10] Li D H, Alison M A, Johnstone K. The American phytopathological society molecular evidence that the extracellular cutinase PbclS required for pathogenicity of *pyrenopeziza brassicae* on oilseed[J]. *RapMPMI*, 2003, 16(6): 45–55.